

VU Research Portal

Tumor exosomes: from loading to release

Verweij, F.J.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Verweij, F. J. (2015). *Tumor exosomes: from loading to release*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

| NEDERLANDSE SAMENVATTING

Samenvatting

In dit proefschrift hebben we belangrijke fundamentele en fysiologische aspecten van tumor exosomen onderzocht. Exosomen zijn kleine blaasjes (40-100nm) die uitgescheiden (gesecreteerd) worden door zowel gezonde cellen als kankercellen. Het vermoeden bestaat dat bij tumoren exosomen een belangrijke rol spelen in het voortschrijden van de kanker (tumorprogressie). De eerste hoofdstukken betreffen onze studies naar het transport van oncogene (kanker-stimulerende) eiwitten, met name hoe deze eiwitten in exosomen geladen worden en welk effect dit vervolgens heeft op de signalering van deze eiwitten in de secreterende cel. In de daaropvolgende hoofdstukken hebben we *in vitro* en *in vivo* live-imaging technieken gebruikt (video-microscopie op levende cellen en organismen) om de moleculaire mechanismen en fysiologische kenmerken van tumor-exosoom secretie te verkennen en de rol hiervan in het proces van tumor progressie.

We zijn onze studies begonnen met gespecialiseerde eiwitten die micro-domains (mini-eilandjes) kunnen vormen in de celmembraan en als zodanig signaleringscomplexen aan de limiterende membraan van zogeheten multi-vesicular bodies (MVBs) recruterende die vervolgens signaleringscascades in gang kunnen zetten. MVBs zijn compartimenten in een cel die bestaan uit een limiterende membraan (LM) die door inwaartse "budding" blaasjes kunnen vormen die intraluminale blaasjes (ILVs) worden genoemd (zie Figuur 1 in het vorige hoofdstuk). Zodra de limiterende membraan van MVBs samensmelt (fuseert) met de buitenste membraan van een cel, de plasmamembraan (PM), komen deze ILVs buiten de cel terecht en worden ze exosomen genoemd ("exo-somos", lett. externe lichamen). Daarnaast hebben we onderzocht welke eiwitten betrokken zijn bij de fusie van MVBs met de plasmamembraan (PM) en de relevantie van exosoom-secretie voor kankercellen aangetoond met behulp van functionele *in vitro* assays en muis-modellen.

Om de determinanten voor het transport van eiwitten naar MVBs te onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van een aantal unieke kenmerken van een oncogeen eiwit van het Epstein-Barr Virus (EBV), LMP1. In het bijzonder gaat het hier om de associatie van LMP1 met het micro-domain eiwit CD63 en de rol van palmitoylatie als post-translationele modificatie, en van beide de rol hiervan op de secretie van LMP1 via exosomen alsmede het effect op de intracellulaire signaling. Het transport van LMP1 in de endo-exosomale route kan gezien worden als een alternatief voor lysosomale degradatie, gezien het feit dat deze transportroute er voor zorgt dat LMP1's activerings-potentie van NF- κ B verlaagd wordt.

We hebben een op CD63 gebaseerde optische sensor ontwikkeld die gevoelig is voor de zuurgraad (pH) en de fusie van MVBs met de PM kan visualiseren in levende kankercellen. Hierdoor konden we aantonen dat MVB-PM fusie in kankercellen continu gebeurt, maar op een lager niveau dan meer "reguliere" transport vesicles. We konden echter het MVB-PM fusie-niveau verhogen door de cellen te stimuleren met histamine, een stof die in veel tumoren verhoogd aanwezig is. Daartegenover konden we het MVB-PM fusie niveau juist verlagen door specifieke eiwitten uit te schakelen die betrokken zijn bij membraanfusie, zogeheten SNARE-eiwitten. Tenslotte

hebben we in samenwerking met een onderzoeksgroep in Utrecht kunnen aantonen dat borsttumoren in een muismodel lokaal en systemisch functioneel mRNA uitwisselen via exosomen wat metastase (uitzaaiing) in de ontvangende cel bevordert. Dit hoofdstuk vat onze meest belangrijke observaties kort samen.

We bestudeerden het effect van exosomale secretie van een viraal oncogeen eiwit op de signalering van dit eiwit in de kankercel zelf (**Hoofdstukken 2-4**). Deze secretie zou namelijk een alternatief mechanisme kunnen zijn voor lysosomale degradatie in de regulering van de sterkte van de pro-kanker signalen die oncogene eiwitten afgeven. Hiervoor bestudeerden we een viraal homoloog (look-a-like) van het menselijke eiwit CD40, Latent Membrane Protein 1 (LMP1) genoemd, dat ge-encodeerd wordt door het wijdverspreide Epstein-Barr Virus (EBV). Dit eiwit staat altijd "aan" (constitutief actief), en geeft dus continu een signaal af, net als veel ander cellulaire oncogene eiwitten. De constitutieve activatie van NFκB door dit virale oncogen zou een belangrijke rol kunnen spelen voor het virus om in zijn gastheer te persisteren, maar is tegelijkertijd een risico voor de ontwikkeling van EBV-geassocieerde lymfomen. LMP1 activeert NFκB via het binden van TRAFs, maar wordt niet gecontroleerd door fosforylering en/of ligand binding. Enigszins verassend vonden we dat LMP1 lysosomale degradatie ontwijkt en ook niet door het proteasoom gedegradeerd wordt, zoals wel voorheen was gesuggereerd. In plaats daarvan associeert LMP1 met micro-domein eiwit CD63 in kleine blaasjes (endosomen) in de cel, en wordt op die manier naar exosomen getransporteerd. Een bijzonder eigenschap van deze LMP1- en CD63-positieve endosomen is dat ze heel weinig cholesterol bevatten, in tegenstelling tot endosomen die alleen CD63-positief zijn (en dus geen LMP1 bevatten).

Omdat een aanzienlijk deel van de in de cel aanwezige LMP1 snel in exosomen terecht komt, op zijn minst binnen 24 uur, hebben we bedacht dat LMP1 in feite een stabiel eiwit zou kunnen zijn, in tegenstelling tot wat voorheen gedacht werd.

We redeneerden dat als exosoom secretie fysiologisch relevant is, snelle lading en secretie van stabiele en constitutief actieve eiwitten in exosomen de signalering van deze eiwitten zou kunnen beïnvloeden. Inderdaad vonden we dat het voorkomen van secretie van LMP1 in exosomen door het uitschakelen van CD63 de LMP1 activatie van NFκB drastisch verhoogde. Dit suggereert dat exosomale secretie van (oncogene) eiwitten door associatie met micro-domein eiwitten een alternatief is voor degradatie, en misschien een eigenschap is van (kanker) cellen om hyper-stimulering te voorkomen.

Vervolgens hebben we het precieze mechanisme van signaal-terminatie door MVBs bestudeerd. Langdurige signalering door eiwitten vanaf de limiterende membraan van MVBs zou namelijk gezonde cellen kunnen transformeren in tumorcellen. We konden aantonen dat LMP1, net voor de lading in CD63-positieve exosomen, zijn binding verliest met de TRAF eiwitten die belangrijk zijn voor NFκB activatie. Het precieze onderliggende mechanisme hiervan is nog niet achterhaald, maar, aangezien een gemuteerde versie van LMP1 die geen TRAFs kan binden veel makkelijker in exosomen terechtkomt, lijkt het er op dat TRAF binding een fysieke blokkade vormt voor het laden in exosomen.

Daarnaast hebben we gekeken naar welke rol palmitoylatie (de toevoeging van een vetzuurketen) van LMP1 speelt in het transport naar MVBs (**Hoofdstuk 4**). Deze toevoeging is een omkeerbaar proces dat van nature bij meerdere eiwitten voorkomt, en vindt bij LMP1 plaats om een specifieke plek binnen het eiwit namelijk aminozuur C78. Mutatie van dit aminozuur zorgde voor een aanzienlijke verstoring in het transport van LMP1 naar de limiterende membraan (LM) van MVBs, met als gevolg dat LMP1 niet meer in exosomen terecht kon komen. We hebben vergelijkbare observaties gedaan voor cellulaire proto-oncogene eiwitten, wat aangeeft dat dit mechanisme niet beperkt blijft tot LMP1, maar een vergelijkbare rol zou kunnen spelen voor meer eiwitten.

Samenvattend: we hebben kunnen zien dat het transport van eiwitten naar MVBs en de lading in exosomen die daar plaatsvindt de beschikbaarheid van eiwitten om aan essentiële signalerings-partners te binden verlaagt, en daarmee is palmitoylatie belangrijk voor de regulatie van de signaalsterkte van oncogene eiwitten.

Parallel aan deze studies hebben we een tool ontwikkeld die direct de fusie van MVBs met de PM kan visualiseren (**Hoofdstuk 6**). De mechaniek en dynamiek van het exosomale secretie proces zijn een essentieel maar ook erg onbekend onderdeel van de biologie van exosomen. Het feit dat we hier nog maar weinig van afweten wordt veroorzaakt door de afwezigheid van de juiste tools om in levende cellen naar het secretie-proces van exosomen te kijken. Tot nu toe moesten de meeste studies naar de fysiologie van exosomen gebruik maken van bewerkelijke isolatie-technieken, die gewoonlijk grote volumes celgroei-medium vereisen, die verzameld worden over langere tijdsperiodes. Het onvermijdelijke gevolg hiervan is het verlies van een fysiologische context en de ongeschiktheid voor directe en kwantitatieve metingen aan exosoom-secretie.

De innovatieve aanpak die wij hier bezigden stelde ons in de gelegenheid een fusie-machinerie en een signalerings-keten te ontrafelen die betrokken zijn bij exosoom-secretie door tumorcellen. We combineerden hiervoor een fluorescente reporter voor exosoom-secretie met een live video-microscopie techniek, TIRF geheten. Hiermee volgden we de MVB-PM fusie-dynamiek en leverden bewijs dat bepaalde SNARE eiwitten, SNAP23 en Syntaxin-4, en een bepaald type receptor (GPCR) de secretie van exosomen controleren. We konden deze receptor-signalerings keten in gang zetten door de cellen te stimuleren met histamine, een stof die naast zijn normale functie ook (verhoogd) aanwezig is in de micro-omgeving van een tumor (TME). Daarnaast konden we de secretie van matrix metalloproteinases (MMPs), eiwitten die betrokken zijn bij het remodeleren van de extra-cellulaire matrix, linken aan de SNARE-gemedieerde secretie route, doordat inhibitie van SNAP23 er voor zorgde dat darm- en baarmoederhalskankercellen *in vitro* een verminderd invasief gedrag vertonen. Het feit dat we deze MMPs ook in de exosomale fracties kunnen aantonen alsmede het feit dat SNAP23 mRNA levels in metastaserende darmkankercellen en baarmoederhalskankercellen verhoogd tot expressie komen, suggereert dat exosomen een rol spelen bij kankerprogressie door beïnvloeding van hun directe omgeving.

Succesvolle behandeling van kanker wordt belemmerd door de heterogene aard van de tumoren. De micro-omgeving van de tumor (TME) en genetische verschillen tussen individuele tumorcellen zorgen voor een variatie in metastaserend gedrag tussen tumorcellen. Om de bijdrage van exosomale communicatie aan het metastaserend gedrag van tumorcellen te bestuderen, hebben we deelgenomen aan studies die gebruik maakten van "intravital" video-microscopie, een techniek waarbij er *in vivo* met hoge resolutie in, in dit geval, een muis gekeken kan worden (**Hoofdstuk 7**). Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van een Cre/LoxP reporter systeem, waarbij de cellen die Cre-positieve exosomen of andere Cre-positieve extracellulaire vesicles (EVs) opnemen, veranderen van kleur. Hierdoor konden we de cellen die wel EVs van een specifieke donorcel-populatie opnamen onderscheiden van de cellen die dat niet deden, en vervolgens het gedrag van deze cellen bestuderen. Zodoende konden we zien dat EVs die door kwaadaardige tumorcellen worden gesecreteerd, door meer goedaardige tumorcellen worden opgenomen, die vervolgens meer het gedrag van de kwaadaardige tumor gaan vertonen, namelijk verhoogd migratoir gedrag en groter vermogen tot uitzaaien (metastase). Onze resultaten suggereren dat deze specifieke effecten na opname van EVs tenminste gedeeltelijk gemedieerd worden door mRNAs die verhoogd aanwezig zijn in deze EVs, en ook specifiek betrokken zijn bij migratie en metastase. Deze "overdracht van kwaadaardigheid" van een metastaserende cel naar een meer goedaardige cel illustreert dat de heterogeniteit in tumorcellen veel complexer is dan momenteel gedacht, en dit zal naar verwachting onze ideeën over de mechanismen van tumorprogressie en de ontwikkeling van optimale behandelingsstrategieën beïnvloeden.